

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Detección y caracterización de *Escherichia coli*
patógeno en carne de pollo por reacción en cadena de
la polimerasa**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Mirtha Fiorella Gutiérrez Urbano
César Andres Sánchez Ortiz

ASESOR

Mirtha Roque Alcarraz

Lima - Perú

2017



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Detección y caracterización de Escherichia coli patógeno en carne de pollo por Reacción en cadena de la Polimerasa”

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**MIRTHA FIORELLA GUTIÉRREZ URBANO Y
CÉSAR ANDRÉS SÁNCHEZ ORTIZ**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECISEIS (16) MUY BUENO

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 08 de mayo de 2017.


Q.F. Benedicta Carmen López Flores
Presidente


Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Miembro


Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Miembro


Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo
Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Dedicatoria:

A nuestros padres por el apoyo incondicional que nos brindaron en cada momento durante esta etapa y sus consejos por hacer de nosotros una mejor persona cada día.

A mis hermanos, demás familiares y amigos en general por el apoyo que siempre nos brindaron día a día en el transcurso de cada año de nuestra carrera universitaria.

Agradecimiento:

A mis maestros por apoyarnos en nuestra formación profesional, especialmente a la Lic. Mirtha Roque Alcarraz por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales, por su tiempo compartido y para la elaboración de esta tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | I |
| SUMMARY | III |
| ABREVIATURAS | V |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. OBJETIVOS | 3 |
| III. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1 Consumo de carne avícola en el Perú..... | 4 |
| 3.2 Enfermedades transmitidas por alimentos | 5 |
| 3.3 <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| 3.4 Epidemiología de <i>Escherichia coli</i> patógeno en el Mundo y Perú:..... | 20 |
| 3.5 Aislamiento y detección de <i>Escherichia coli</i> patógeno en carne de pollo ... | 22 |
| 3.6 Flujograma..... | 33 |
| IV. PARTE EXPERIMENTAL | 34 |
| 4.1 Tipo de Estudio..... | 34 |
| 4.2 Tamaño de la muestra y plan de muestreo | 34 |
| 4.3 Transporte de muestras | 34 |
| 4.4 Lugar de ejecución | 34 |
| 4.5 Materiales, Equipos y Reactivos | 35 |
| 4.6 Metodología..... | 38 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| V. RESULTADO | 44 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 50 |
| VII. CONCLUSIONES | 55 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |
| IX. ANEXOS..... | 64 |

RESUMEN

Escherichia coli es una de las más importantes bacterias relacionadas con enfermedades gastrointestinales humanas, especialmente en niños de los países en vías de desarrollo, como Perú. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), relacionadas con *Escherichia coli* siguen siendo uno de los principales desafíos para la Salud Pública a nivel nacional e internacional. El desarrollo de estrategias de prevención y control requiere de un trabajo multidisciplinario.

El principal objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Escherichia coli* patógeno en carne de pollo, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se usaron 50 muestras de carne de pollo provenientes de 5 mercados y 2 supermercados de Lima Metropolitana. La extracción de ADN se hizo a partir de un cultivo de enriquecimiento de las muestras, mediante la técnica de lisis celular directa, los ADN genómicos extraídos fueron analizados por PCR múltiplex usando primers específicos para factores de virulencias de *Escherichia coli* patógena (BfpA, Eae, Stx1 y Stx2).

Los resultados mostraron la presencia de *Escherichia coli* patógena en todas las muestras recolectadas. El método de PCR fue altamente específico y mostró una detección temprana de *Escherichia coli* patógena. La normativa actual no considera la diferenciación entre las cepas comensales con las patógenas, sólo considera la presencia o ausencia de *Escherichia coli* mediante un recuento

microbiológico y establece un límite. Este método podría evitar posibles brotes endémicos.

En este estudio se detectó la presencia de *Escherichia coli* patógeno productor de la toxina shiga tipo 1 (STX1).

Palabras claves: Carne de pollo, *Escherichia coli*, Shiga toxina, PCR.

SUMMARY

Escherichia coli is one of the most important bacteria related to human gastrointestinal diseases, especially in children of all the developing countries like Peru. Foodborne diseases associated with *Escherichia coli* remains one of the main challenges for public healthcare at national and international level. The development of prevention and control strategies must be a multidisciplinary work.

The main objective of this study was to determine the presence of pathogenic *Escherichia coli* in chicken meat; this was carried out by the polymerase chain reaction (PCR) method.

Fifty samples of chicken meat from five markets and two supermarkets, from Metropolitan Lima, were used. The DNA extraction procedures were performed from enrichment cultures of the samples using the direct cell lysis method. The extracted genomic DNA were analysed with multiplex-PCR, using the specific primers for virulence factors of pathogenic *Escherichia coli* (stx1, stx2, eae and BfpA).

All samples showed the presence of pathogenic *Escherichia coli*. The PCR method was highly specific and showed an early detection of pathogenic *Escherichia coli*. The current legalisation does not consider the differentiation between commensal and pathogenic strains, it only considers the presence or absence of *Escherichia coli* through microbiological count and sets limit. This method could avoid possible endemic outbreaks of pathogenic *Escherichia coli*.

In this study, the presence of shiga type 1 (STX1) toxin producing pathogenic *Escherichia coli* was detected.

Key words: Chicken meat, *Escherichia coli*, Shiga toxin, PCR.

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

STX 1: Toxina Shiga tipo 1.

STX 2: Toxina Shiga tipo 2.

Bfp: "Bundle-forming pilus" (Pelos formadores de penachos).

Eae: Gen ligado al fenómeno A/E.

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

MINSA: Ministerio de Salud.

ADN: Ácido Dexosirribonucleico.

STEC: *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga.

O157: H7: Serotipo de *Escherichia coli*.

PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

TSA: Agar Triptosa de Soja.

LIA: Agar Hierro Lisina.

MIO: Medio de Movilidad, Indol y Ornitina.

I. INTRODUCCION

El presente trabajo se realizó con el fin de monitorear *Escherichi coli* patógeno en la carne de pollo, por ser una de las principales fuentes de proteína a nivel nacional por su accesible costo. Según el Ministerio de Agricultura y Riego ⁽¹⁾, en el año 2012, el consumo de pollo per cápita en el Perú fue 39 kg/habitante llegando a ocupar el tercer lugar a nivel de Sudamérica sólo superados por Brasil y Argentina.

En un informe de OMS ⁽²⁾, el más completo publicado hasta la fecha sobre el impacto de los alimentos contaminados en la salud y el bienestar, se concluye que casi un tercio (30%) de todas las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria se producen en niños menores de 5 años, pese a que los niños de esa edad representan solo 9% de la población mundial. Una de las bacterias más estudiadas y a la cual se hace referencia en casos epidémicos de ETA es *Escherichia coli* patógena, la cual ha estado inmersa en diferentes brotes endémicos a nivel mundial siendo uno de los casos, el sucedido en Europa en el 2011, en el caso de Perú, la entidad sanitaria emitió una alerta epidemiológica ^(3, 4, 5).

Esta bacteria suele estar en la vía digestiva de los animales por lo cual es fundamental la manipulación adecuada de estos alimentos. Muchas veces hemos visto cómo se expende la carne de pollo en los diversos mercados de Lima Metropolitana, en ambientes donde las carcasas permanecen durante todo el día apilados en fuentes que carecen de sanitización o son fraccionados con instrumentos oxidados o en mal estado. Esto sumado a la poca cocción que se da

en algunas ocasiones, por la propia gastronomía peruana, puede llegar a originar el consumo de este tipo de bacteria, lo cual podría originar una infección por los diversos tipos de *Escherichia coli* patógeno que podrían presentarse y que son de diversos niveles de riesgo.

El propósito de esta investigación es evidenciar la manipulación inadecuada y la deficiencia higiénica de la carne de pollo ya que este alimento podría convertirse en un foco de infección para la población en general. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ayudar a que las autoridades municipales y sanitarias pongan énfasis en la venta y distribución de la carne de pollo para la prevención de ETA.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar *Escherichia coli* patógeno en carne de pollo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Recuperar *Escherichia coli* a partir de un medio de enriquecimiento no selectivo.
2. Aislar *Escherichia coli* en medios de cultivo selectivos.
3. Realizar la identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas.
4. Detectar *Escherichia coli* patógeno por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Consumo de carne avícola en el Perú:

En el Perú, el consumo de carne avícola ha ido incrementándose conforme ha transcurrido el tiempo, según el Ministerio de Agricultura y Riego, Lima es la región con mayor producción de carne de pollo en el país, con 53%; además, en el año 2012, el Perú ocupó el tercer lugar a nivel Sudamericano en cuanto a consumo per cápita de carne de pollo con 39 Kg/habitante, situándose por debajo de Brasil y Argentina, según muestra la Figura 1.

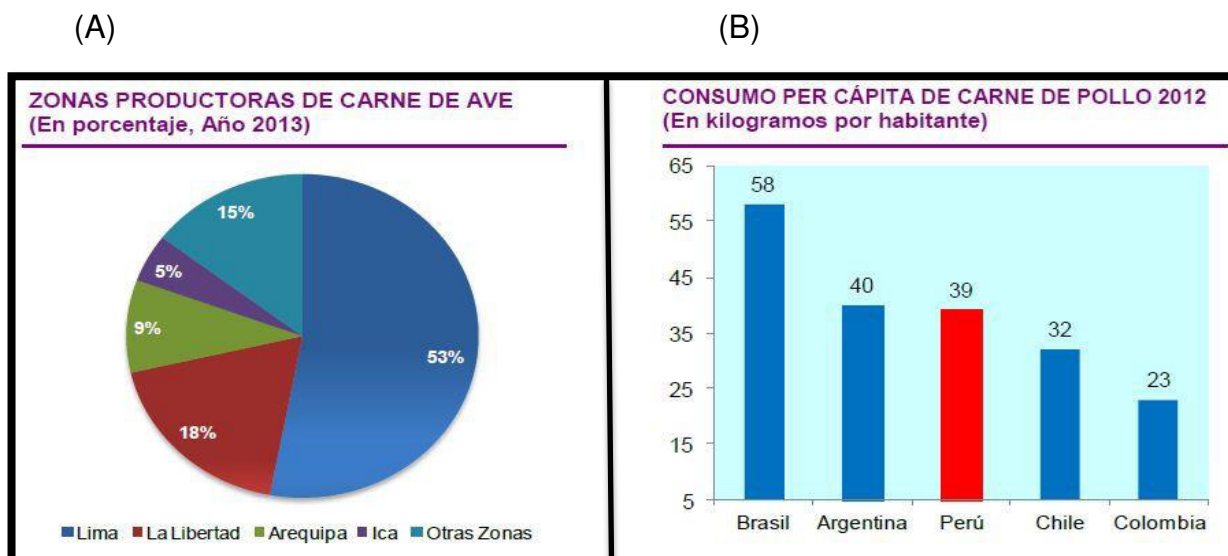


Figura 1. Zonas productoras de carne de ave(A) ⁽¹⁾ y consumo per cápita de carne de pollo(B) ⁽⁶⁾.

Para el año 2015, se incrementó la producción avícola debido a una mayor demanda de la carne de pollo, así como a sus bajos costos comparados con otros alimentos de fuente proteica. Además, se puede observar en la tabla 1 que el consumo per cápita de carne de ave (principalmente de pollo) se incrementó en 6,1% respecto al 2014 ⁽¹⁾.

Tabla 1: Disponibilidad per cápita de la carne de ave, carne de pollo y huevo de gallina en el Perú, expresado en (Kilogramos/habitantes/mes)

| Producto | Feb-14 | Feb-15p | Var. % |
|------------------|--------|---------|--------|
| Carne de ave | 3,3 | 3,5 | 6,1 |
| Carne de pollo | 3,1 | 3,2 | 6,1 |
| Huevo de gallina | 0,9 | 1,0 | 6,4 |

Fuente: MINAGRI-DGESEP-DEA ⁽¹⁾

Así también, la adquisición de carne de pollo en Lima Metropolitana se produce en un 80% aproximadamente en los mercados de abastos, en menor proporción en centros comerciales y un mínimo porcentaje se obtiene de una producción a escala familiar ^(1, 6).

3.2 Enfermedades transmitidas por alimentos:

Las ETA, son parte de un creciente problema de salud pública a nivel mundial, que se producen por la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas; los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de ETA son de origen animal, ya sea carne bovina, huevos, carne de ave, pescados, etc.

La manifestación clínica más común de una ETA es la aparición de problemas gastrointestinales que si no son tratadas a tiempo pueden ocasionar diversos problemas multiorgánicos e inclusive ocasionar la muerte.

Las ETA pueden producirse ya sea por el mismo microorganismo o por la toxina que este produce, es por ello que se clasifican en infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxinas. Las infecciones más importantes se producen por microorganismos como las bacterias *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*,

virus como la de Hepatitis A, nemátoda como la *Trichinella spirallis*, entre otros ^{(7;}
8).

3.3 *Escherichia coli*:

Fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en 1885, quien determinó que existía esta bacteria bajo la forma de huésped habitual del ser humano. En 1919 se le dio la denominación, por Castellani y Chalmers, y se convirtió de manera rápida en el género típico de las *Enterobacteriáceas* ⁽⁹⁾.

Escherichia coli patógena es una bacteria que se encuentra involucrada en la mayoría de enfermedades infecciosas que afectan al ser humano, actualmente es la bacteria que se muestra recurrente en los diversos casos infecciosos que aquejan a la población, además de ser la bacteria con mayor índice de recuperación en las muestras clínicas ^(8,10).

3.3.1 Características:

Escherichia coli es un bacilo Gram (-), aerobio y considerado como anaerobio facultativo, con flagelos peritricos; es parte de la flora bacteriana intestinal de los seres humanos y de algunos animales de sangre caliente como saprobio, ya que es una bacteria mesófila; por ende, es sensible a temperaturas inferiores a los 7°C y superiores de los 70°C. Posee una sola cadena espiral de ADN, con una carga genética de 5 000 genes ^(10; 11).

3.3.2 Estructura:

Al ser una bacteria Gram (-) posee estructuras típicas como la cubierta que consta de 3 elementos básicos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y el

espacio periplasmático constituido por peptidoglucano, la cual le brinda forma y rigidez, además de permitir la resistencia a situaciones adversas. Inclusive se pueden hallar fimbrias y estructuras relacionadas a la patogenicidad de la bacteria

(11; 12)

3.3.3 Taxonomía:

Esta bacteria pertenece al género *Escherichia*, de la tribu *Escherichieae*, perteneciente a *Enterobacteriaceae* como se puede observar en la figura 2 ⁽¹⁰⁾.

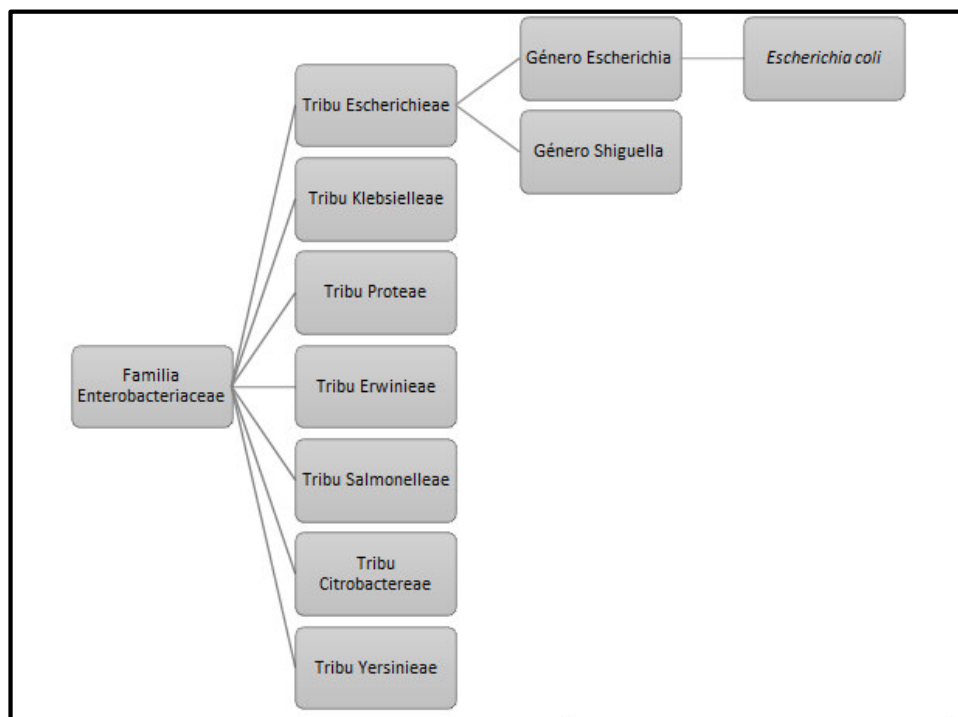


Figura 2: Taxonomía *Escherichia coli*. Fuente: Koneman's ⁽¹⁰⁾

Estas bacterias pueden transmitirse indirectamente a través de agua o alimentos contaminados. Se conocen diferentes cepas capaces de producir diversos cuadros de gastroenteritis a continuación pasaremos a describir cada una de ellas.

3.3.3.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):

Produce una enfermedad endémica en los niños pequeños y presenta un alto índice en los viajeros, ya que se encuentra frecuentemente en países en desarrollo; se transmite mediante vía oral, es decir, por consumo de alimentos o agua contaminados. Su toxicidad se produce por 2 enterotoxinas, una termolábil (LT) y otra termoestable (ST), además posee fimbrias, que actúan como factores de colonización o antígeno de adherencia ⁽¹³⁾.

A lo largo de los años se han presentado diversos brotes endémicos relacionados a esta cepa como el ocurrido en Yokohama, la cual afectó a niños de 4 escuelas; o en el brote transmitido por agua contaminada que afectó a soldados israelíes y civiles en las alturas de Golan en 1998⁽¹³⁾.

3.3.3.2 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC):

Se presenta con frecuencia en países en vías de desarrollo, se empieza a estudiar a partir de un brote localizado en Inglaterra a mediados de los 40. La población infantil menor a 2 años es la más susceptible a la infección con una mayor prevalencia en lactantes hasta los 6 meses y con una elevada letalidad. Esto debido a que se produce una alteración histopatológica a nivel intestinal conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación) que induce una degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito ⁽¹⁴⁾.

3.3.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC):

Esta cepa afecta a todos los grupos etareos principalmente en países en vías de desarrollo, y su transmisión se produce por consumo de agua o alimentos contaminados. Aunque no se conocen brotes endémicos de este tipo de cepa, se sabe que representa hasta el 5% de los episodios asociados a infecciones producidas por *Escherichia coli* patógeno, además esta cepa se difunde entre las células intestinales, provocando una diarrea sanguinolenta similar a la disentería (15).

3.3.3.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC):

Esta es la cepa de mayor importancia a nivel médico y epidemiológico ya que es productora de la toxina Shiga (STEC), produce diversas enfermedades severas en el hombre como púrpura trombocitopénica trombótica (PPT) y la colitis hemorrágica (CH), que se deriva a un síndrome urémico hemolítico (SUH) la cual es causante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos (16).

Fue detectado como patógeno en 1982, siendo la STEC O157:H7 la responsable de diversos brotes a nivel mundial, se conoce que su principal reservorio suelen ser el ganado vacuno y el ovino, y se transmite mediante vía oral ya sea por consumo de alimento o vegetales contaminados, por el contacto directo del hombre con animales infectados o con otras personas infectadas, esto debido a las bajas dosis infectivas que posee este grupo bacteriano (100 bacterias/g) (17).

Los factores de virulencia de la STEC son conocidas como Shigatoxinas, debido a que fueron neutralizadas con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Están compuestas por una estructura de tipo A1B5, la cual comprende una subunidad A catalítica de 32 kDa asociada no covalentemente con un pentámero de subunidad B que está implicado en la unión de la toxina a los receptores específicos de glucolípidos en la superficie de las células diana. La citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de este serotipo, esta toxina actúa a nivel de la síntesis de proteínas por su unión a la subunidad 60S de los ribosomas de células renales o intestinales del hospedero ⁽¹⁸⁾.

En la actualidad se presentan variantes de esta toxina, la STX 1 y la STX 2, las cuales difieren en su efecto citotóxico. Además, STX 2 es más tóxica en humanos y aumenta el riesgo de SUH ^(19, 20).

Ambas variantes están constituidas por una subunidad A y 5 monómeros de subunidad B, las cuales forman una estructura pentamérica que es la responsable de la unión de la toxina a las células de huésped a través del receptor globotriaosilceramida (Gb3) y la expresión en la superficie está ligada a la citotoxicidad. Una vez que la toxina se ha unido a su receptor, ingresa y realiza un transporte retrógrado a través del complejo de Golgi hacia el retículo endoplasmático y la membrana nuclear. La subunidad A se trasloca al citoplasma donde actúa como una glicosidasa removiendo una adenina de la unidad ribosomal 28S, y de esa manera inhibe la síntesis de proteínas; por otro lado, se cree que la subunidad B se encarga de estimular la apoptosis celular ^(19, 20).

Además, otro factor que se relaciona con la patogenicidad de la bacteria es el gen *eae* o intimina, que se encuentra asociada a la adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos provocando el fenómeno conocido como “adherencia y destrucción” (lesión A/E). Este fenómeno se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades a través de la reestructuración del citoesqueleto subyacente. ^{(21.}

22, 23)

3.3.3.5 *Escherichia coli* enteroagregante (EAEC):

Esta cepa suele presentarse en infantes en los países en desarrollo, además es la responsable más frecuente de diarrea persistente en lactantes. Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC, pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente ⁽²¹⁾. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2. La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I). Por ello, se adhiere a los enterocitos con una biocapa conformada por las bacterias agregadas y moco, que poseen un efecto citotóxico a nivel de la mucosa intestinal ⁽²⁴⁾.

3.3.3.6 *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC):

Una de las últimas cepas en describirse, la cual prevalece en niños menores de 4 ó 5 años, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2 ⁽¹⁸⁾. Se

sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido ⁽²⁵⁾.

El grupo DAEC se puede aislar tanto a partir de muestras de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 ó 5 años ^(21; 25).

En la Tabla 2 se presenta un resumen de las diferentes cepas patógenas de *E. coli*.

Tabla 2. Características de los grupos de *Escherichia coli* patógeno causante de diarrea

| Grupo | Síntomas Clínicos | Epidemiología | Factores de Patogenicidad |
|-------------|---|---|---|
| EHEC | SUH. PPT. CH | Niños y adultos. | STX. A/E. pO157. |
| ETEC | Diarrea acuosa. | Niños < 2 años. Diarrea del viajero. | ST y LT. CFA. |
| EIEC | Diarrea con moco y sangre, cuadro disentérico. | Niños < 6 meses. | Invasividad, plásmido de 140MDa. |
| EPEC | Diarrea aguda. | Niños < 2 años. | Plásmido EAF de 50 a 70 MDa. |
| EAEC | Diarrea líquida, verde con mucosidad y persistente. | RN y niños < 2 años. | Fimbrias AAF/I y II EAST I. OMP. Citotoxina. |

Fuente: Rodríguez ⁽²¹⁾

3.3.4 Factores de virulencia:

Los factores o determinantes de virulencia son características genéticas, bioquímicas o estructurales de las bacterias que interactúan con factores del hospedero y causan daño ^(10, 26).

En 1947 Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación llamado "Kauffman-White", en la que propone una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli*, la tipificación serológica se basa principalmente en la determinación del tipo de antígeno "O", "H" y "K" ⁽²¹⁾.

Actualmente se conocen 173 antígenos somáticos (O), 53 antígenos flagelares (H) y 72 antígenos capsulares (K). El antígeno somático determina el serogrupo y la determinación del O:H indica el serotipo, el cual es relacionado con un cuadro clínico en particular ^(21, 26), por otro lado, los antígenos O y K poseen propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero, además de brindar la virulencia de las cepas invasivas. Poseen una endotoxina ligada al polisacárido (al lípido A), responsable de la acción pirógena, además pueden presentar genes asociados con la capacidad de adherencia, producción de colicinas, hemolisinas o resistencia a antibióticos ^(21, 22, 23 24, 25).

Esta forma de clasificación serológica resulto muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inocuas ⁽²⁶⁾.

Las cepas de *Escherichia coli* patógeno, poseen diferentes factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad, como vemos en la

Tabla 3 se mencionan los grupos de *Escherichia coli* con los factores de virulencia y las secuencias de oligonucleótidos usadas en PCR ⁽²¹⁾.

Tabla 3. Factores de virulencia y secuencia de oligonucleótidos.

| Grupo | Factor de virulencia | Secuencia de oligonucleótidos usadas en PCR |
|-------------|----------------------|--|
| ETEC | STI | TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC |
| | STaII | TTGTCTTTTTACCTTTCCC ACAAGCAGGATTACAACACA |
| | LT | GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC |
| EHEC | eae | CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT |
| | STX1 | TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTGCTC |
| | STX2 | CCCAGTCACGACGTTGTA TATACTATCGTGCGTTTCCA |
| EIEC | IaI | CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAAATTATTTCC |
| EPEC | EAF | CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA |
| | BFP | AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA |
| EAEC | Plásmido | CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCGCTGTT |

Fuente: Rodríguez ⁽²¹⁾

La adherencia de *Escherichia coli* a los enterocitos, es debida a la presencia de unos filamentos proteicos que se proyectan a lo largo de toda la superficie de la bacteria que reciben el nombre de fimbrias o pili que actúan aportando su capacidad de adherencia ^(21,22,26).

A continuación, pasaremos a describir algunos factores de virulencia que se han detectado en *Escherichia coli* patógena.

3.3.4.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC):

La infección por EPEC se caracteriza por producir la lesión histológica llamada "ataque / destrucción" (A/E) y se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria al enterocito y destrucción de la microvellosidad ⁽²⁷⁾.

Se han descrito 3 etapas en la lesión A/E:

- **Adherencia localizada:** para ello poseen una adhesina BFP (bundle forming pilus) codificada en el plásmido EAF (EPEC adherence factor). Dicha adhesina es responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a las células HEp-2 ⁽²⁶⁾.
- **Transducción de señales:** por la adherencia de EPEC a la célula epitelial, se induce una serie de señales de transducción. Como consecuencia de estas señales aumenta el Ca^{+2} , se inhibe la absorción de Na^+Cl^- y se estimula la secreción de Cl^- en el enterocito ⁽²⁶⁾.

Los genes bacterianos responsables de esta actividad están codificados en un "Islote de patogenicidad" LEE (locus of enterocyte effacement) y son eae, tir, esp y sep. El gen eae codifica una proteína de la membrana externa denominada intimina que es la responsable de la adhesión íntima de la bacteria al enterocito y el gen tir codifica el receptor celular al que se une la intimina ^(26, 27).

- **Adherencia íntima:** la bacteria después de unirse a distancia del enterocito mediante fimbrias BFP, excreta el receptor tir que se fija al enterocito y a continuación la bacteria se une íntimamente a éste, al fijarse la intimina al receptor tir ⁽²⁶⁾.

El gen *esp* codifica proteínas necesarias para la producción de la lesión de A/E de la microvellosidad intestinal y la condensación de la actina del citoesqueleto celular que provoca la aparición de un pedestal sobre el que reposa la bacteria (26).

En la figura 3 podemos ver el mecanismo de los factores de virulencia de la *Escherichia coli* enteropatogénica.

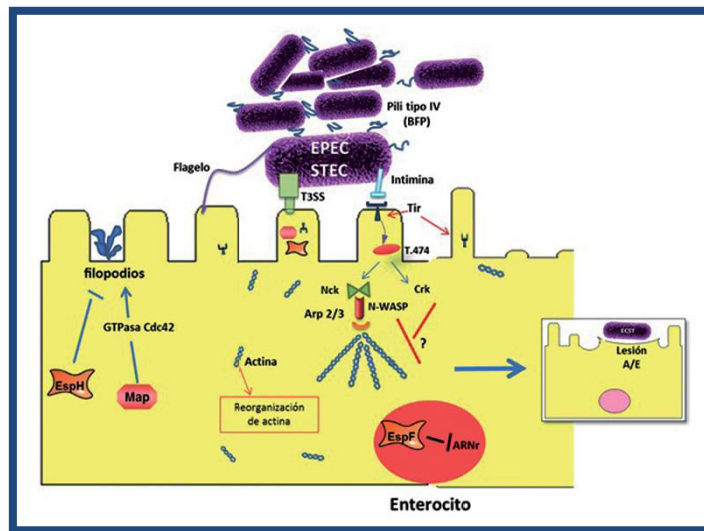


Figura 3: *E. coli* enteropatógena. La adherencia de EPEC está mediada por un flagelo y por el pili tipo IV (BFP) que también une las bacterias entre sí formando microcolonias, permitiendo que éstas se separen y colonicen. Map que induce la formación de filopodios activando una GTPasa Cdc 42, aunque sólo es momentáneo porque después EspH interrumpe esta formación para que otra proteína llamada Tir unida a la intimina (proteína de la membrana externa de la bacteria) se fosforile en tirosina 474, el cual se une a proteínas adaptadoras como Nck o Crk. Nck activa a N-WASP que a su vez activa Arp 2/3, mediador de la polimerización de actina. La unión Tir-Intimina finalmente provoca la reorganización de la actina, alterando la morfología y formando las lesiones de adhesión y borrado (A/E) (27).

3.3.4.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC o VTEC):

Esta cepa produce una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le denominó verotoxina (VT), la cual se neutralizaba con la antitoxina obtenida de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que se le denominó toxina semejante a shiga o "toxina shiga" (STX) y a las bacterias capaces de producirlas STEC (26).

La STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC, destruye las células Vero, inhibe la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S de las células intestinales del hospedero. Existen 2 tipos de verotoxinas STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, pero que pueden sintetizarse ambas o una de las 2 toxinas ⁽²⁶⁾.

También presentan el fenómeno A/E donde se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias codificadas en el plásmido pO157 (60 MDa) y posteriormente barren la microvellosidad intestinal por la acción de las proteínas presentes en su membrana externa que están controladas por el gen cromosómico eae y reciben el nombre de intiminas. Los EHEC se unen íntimamente a los enterocitos, pero no llegan a invadirlos intracelularmente ⁽²⁶⁾.

En la figura 4 podemos ver el mecanismo que emplea esta cepa bacteriana.

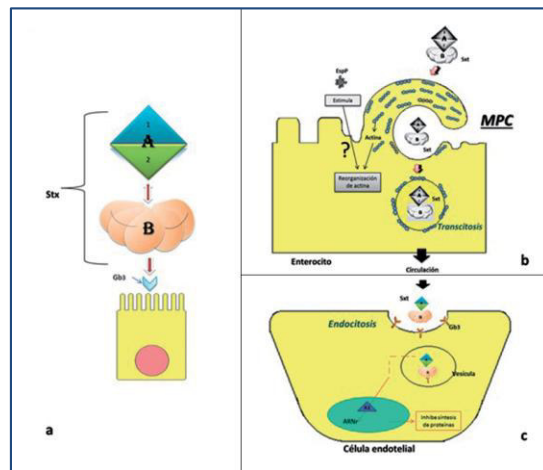


Figura 4: **a.** La toxina Shiga (Stx) está compuesta por una subunidad A que tiene dos fragmentos: A1 con actividad enzimática y A2 que se une a la subunidad B, pentámero encargado de la unión al receptor Gb3 en la célula hospedera; **b.** Existen factores como EspP que estimulan la reorganización de actina en ausencia de receptores Gb3, que permiten la entrada de Stx al enterocito por medio de macropinocitosis (MPC) y se desplaza dentro de la célula por transcitosis para llegar a la circulación; **c.** Sxt viaja hasta encontrar el receptor Gb3 que se une a la subunidad B de la toxina y permite la entrada a las células endoteliales por endocitosis, donde la subunidad A1 se dirige al ARNr para bloquear la síntesis de proteínas y producir la muerte celular ⁽²⁷⁾.

3.3.4.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC):

El mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon, los genes necesarios para ello son llevados por el plásmido mxi y spa que codifican un aparato de secreción de proteínas de tipo III similar al que poseen ECEP y ECVT. Este aparato produce la secreción de múltiples proteínas de la membrana externa (OMP) que están implicadas en el proceso invasivo y que se denominan proteínas Ipa⁽²⁶⁾.

ECEI evade la respuesta inmune porque entra fácilmente a las células epiteliales del colon por medio de adhesinas, moviéndose lateralmente para invadir otras células. En la mucosa del colon, ECEI invade inicialmente las células M y en una vacuola fagocítica por transcitosis la bacteria atraviesa la barrera epitelial e invade los macrófagos. En éstos la proteína IpaB, lisa la vacuola en el citoplasma e induce apoptosis vía caspasa 1 para finalmente ser liberada y alcanzar el polo basolateral⁽²⁸⁾.

Posteriormente, la bacteria ingresa a las células intestinales mediante el reconocimiento de los receptores CD44 y $\alpha 5\beta 1$ integrina gracias a IpaB y al complejo IpaBCD bacteriano. Después de su multiplicación en el citoplasma, se libera del fagosoma mediante IpgD y se desplaza lateralmente entre una y otra célula⁽²⁸⁾.

3.3.4.4 *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC):

Se caracteriza por el fenómeno de adherencia difusa, presenta dos tipos de adhesinas: la fimbria F1845 y una proteína de la membrana externa conocida

como AIDA-I, que les permite adherirse a las células Hep-2 cultivadas in vitro siguiendo un patrón de adherencia difuso. Tras adherirse al epitelio intestinal provocan una elongación de la microvellosidad que engloban las bacterias, sin que se produzca una invasión interna, pero la presencia de dichas estructuras no se ha podido demostrar in vivo ⁽²⁶⁾.

3.3.4.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC):

Presentan fimbrias (AAF/I y AAF/II) que les permite adherirse de forma agregativa a las células Hep-2 y unirse al epitelio intestinal. Provocan un aumento de la secreción del mucus que conduce a la formación de un biofilm donde quedan atrapadas las células ^(26, 27).

Posteriormente produce una enterotoxina termoestable llamada EASTI (enteroagregativa ST1) y una citotoxina de 108 KDa que pueden ser responsables de la diarrea y de las lesiones histopatológicas ⁽²⁶⁾.

La fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I) es codificada por el gen aggA, mientras que la fimbria AAF/II esta codificada por el gen aafA; sin embargo, es posible que algunas EAEC no presenten estas fimbrias ⁽²⁶⁾.

3.3.4.6 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):

Su patogenicidad involucra factores de colonización, expresión de adhesinas intestinales y la producción de enterotoxinas. Los factores CFA/I a CFA/IV se adhieren fuertemente por medio de las fimbrias denominadas longus y suministran

toxinas al epitelio, allí producen uno o dos tipos de enterotoxinas: LT (termolábil) y ST (Termoestable) ⁽²⁶⁾.

La LT es una proteína de elevado peso molecular, constituida por una subunidad A y 5 subunidades B. Mientras que la ST son pequeños polipéptidos que contienen múltiples residuos de cisteína que le confiere estabilidad, para poder causar daño a las células epiteliales ⁽²⁶⁾.

Ambas enterotoxinas pueden manifestarse juntas o solo una de ellas, actúan al desencadenar el sistema de adenilciclase, incrementando la concentración de adenosín o guanosín monofosfato cíclico en los enterocitos, lo que provoca la salida de agua y electrolitos al lumen intestinal ⁽²⁶⁾.

3.4 Epidemiología de *Escherichia coli* patógeno en el Mundo y Perú:

Escherichia coli se encuentra normalmente en el intestino de animales de sangre caliente como los seres humanos y las cepas patógenas llegan a infectar al hombre a través del consumo de alimentos contaminados como carne cruda o poco cocida, leche cruda y vegetales ^(29, 30).

Según el informe realizado por la OMS en el 2015, se estima que los niños menores de 5 años son los más perjudicados al representar un tercio de las muertes por enfermedades alimentarias, las cuales son ocasionadas por enfermedades diarreicas producidas por ingestión de alimentos contaminados por *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoídica y *Escherichia coli* patógeno. Se informa que la *Escherichia coli* es un agente patógeno común en países con ingresos

bajos y medianos. Este mismo informe señala que en América, *Campylobacter*, *Escherichia coli* patógena y *Salmonella* no tifoidica causan el 95% de casos de enfermedades por transmisión alimentaria ⁽²⁾.

Las enfermedades diarreicas suelen presentarse con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, como es el caso de Perú, las causas más comunes se deben a rotavirus y *Escherichia coli* patógena. Este hecho agrava la malnutrición que aqueja a gran parte de la población infantil en el Perú y el mundo, ya que las enfermedades diarreicas empeoran el estado nutricional, este hecho se agudiza debido a las malas condiciones sanitarias de la población ⁽³¹⁾

Se conoce que la EHEC puede causar daños graves que pueden llegar incluso a la muerte si es que no son tratados a tiempo. El peligro de infección radica en el hecho que esta cepa produce una toxina conocida como verotoxina o toxinas de Shiga. Esta cepa cobró importancia en la salud pública a partir de un brote producido en Estados Unidos en 1982. Luego de ello se produjo otro brote en el 2011 en Alemania conocido como Brote del Síndrome Urémico Hemolítico que causó la muerte de alrededor de 32 personas, miles de infectados y una millonaria pérdida monetaria debido a que se relacionó con el consumo de diversos productos agrícolas primero en España y luego en Alemania. A finales de julio del 2011 se dictaminó que la epidemia había cesado en Alemania ^(31, 32).

En la infección causada por EHEC se presentan síntomas como calambres abdominales y diarreas, las cuales llegan a ser sanguinolentas y en casos de mayor gravedad se presenta el síndrome hemolítico urémico (SHU) que se caracteriza por presentar una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y

trombocitopenia. Este cuadro puede llevar inclusive a ocasionar complicaciones a nivel neurológico ⁽³²⁾.

El reservorio de este patógeno es principalmente mamíferos y aves, se transmite al hombre por el consumo de estos alimentos contaminados, así como, por contaminación cruzada durante la preparación de estos (superficies y utensilios de cocina contaminados). Es por ello que se deben aplicar medidas de control desde la producción agropecuaria hasta la preparación de los alimentos ⁽³²⁾.

En el año 2013 el Ministerio de Salud emitió un comunicado para alertar a la población sobre el ingreso a nuestro país de productos envasados los cuales estaban contaminados con *Escherichia coli* patógeno, esto producto de la alerta a nivel mundial que dio la FDA sobre la pizza congelada Stuffed Crust Pizza Dippers y los snacks Mozzarella Bites al horno, ambos de la marca Farm Rich; donde indica que la empresa encargada de producir estos alimentos decidió su retiro del mercado por voluntad propia. El comunicado indicaba que la empresa ya había realizado la venta de estos productos a nuestro país e instaba a las empresas comercializadoras retirar del mercado peruano estos productos y ponerlos a disposición de la entidad peruana a fin de realizar su eliminación ⁽³³⁾.

3.5 Aislamiento y detección de *Escherichia coli* patógeno en carne de pollo

3.5.1. Recolección de las muestras

Los métodos o planes de muestreo se refieren a la manera como se realiza, y al número de canales de pollo o alimentos que se utilizan para aplicar alguna técnica de laboratorio, para detectar bacterias de importancia en el producto o alimento.

Esto surge porque es imposible desde el punto de vista práctico y económico que todas las canales procedentes de una parvada sean objeto de un análisis de laboratorio, de ahí que se utiliza un grupo de ellas que pueda representar al lote.

Los planes de muestreo deben considerar la probabilidad de detección de microorganismos en un lote, teniendo en cuenta que ningún plan de muestreo puede asegurar la ausencia de un determinado organismo. Los planes de muestreo deben ser administrativa y económicamente factibles para las plantas de procesamiento.

Los aspectos a considerar en la elección del método de muestreo son: que pueda llevarse a cabo sobre la línea de procesamiento y considerar la distribución heterogénea y mecanismo de adhesión de los microorganismos en la superficie de la canal; buscando que las canales o muestras a utilizar sean representativas de lo que sucede en el lote. ^(34, 35)

El tiempo que transcurra entre la toma de las muestras de campo y su análisis deberá ser lo más breve posible, y durante el transporte al laboratorio las condiciones de temperatura de la muestra deben permitir la viabilidad de los microorganismos ⁽³⁶⁾.

Las normas microbiológicas para la carne picada de pollo se encuentran la Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA, como podemos observar en la tabla 4 en la cual se da una serie de criterios microbiológicos para el análisis de carnes crudas ya sean picadas o molidas ⁽³⁷⁾.

Tabla 4. Criterio microbiológico de las carnes crudas picadas y molidas

| Agente microbiano | categoría | clase | n | c | Limite por g | |
|--|-----------|-------|---|---|-----------------|-------------------|
| | | | | | m | M |
| Aerobios mesofilos(30°C) | 2 | 3 | 5 | 2 | 10 ⁶ | 10 ⁷ |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 3 | 5 | 2 | 50 | 5x10 ² |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 7 | 3 | 5 | 2 | 10 ² | 10 ³ |
| <i>Salmonella sp.</i> | 10 | 2 | 5 | 2 | Ausencia/ 25g | ----- |
| <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 | 10 | 2 | 5 | 2 | Ausencia/ 25g | ----- |

n: Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M en un plan de muestreo de 3 clases.

m: Limite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable.

M: Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

Fuente: MINSA⁽³⁷⁾

3.5.2 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*:

Escherichia coli pertenece a las *Enterobacteriaceae*, las cuales por estructura se conoce que son Gram negativas (-), además son de fácil cultivo y anaerobios facultativos, por lo cual no requiere mayores exigencias en cuanto a los nutrientes necesarios para su crecimiento, es por ello que se emplea un caldo nutritivo para favorecer su recuperación^(10, 11, 26).

Su crecimiento se favorece a una temperatura de 37°C. Además, son bacterias fermentadoras de carbohidratos, por ejemplo, de lactosa, por lo cual una forma de reconocerlas es empleando caldo lactosado, el cual es positivo al presentar formación de gas luego de 24 horas de incubación a 37°C⁽¹¹⁾.

Son bacterias catalasas positivas y oxidasas negativas, reducen nitratos a nitritos y producen vitaminas B y K^(10, 38).

También se emplea el caldo MacConkey para el cultivo de bacterias gram negativas (-) fermentadoras de lactosa, y el agar MacConkey para el aislamiento de *Escherichia coli*, ya que estas se presentan en forma de colonias grandes, rojas y con un halo ⁽¹¹⁾.

Para la identificación se utilizan diferentes métodos ya sea tradicionales o de biología molecular. En los métodos tradicionales, después de aislar la bacteria se realiza las diversas pruebas bioquímicas, una de las pruebas a realizar es la del TSI (que se basa en la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico) ⁽¹¹⁾.

Si las diversas pruebas dan positivo es un indicio de presencia de *Escherichia coli*, pero si se da un resultado negativo, no se puede precisar la ausencia de la bacteria, para confirmar los resultados se requiere métodos de biología molecular como pruebas serológicas.⁸

En la Tabla5 se presenta un resumen de la identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas.

Tabla 5. Identificación bioquímica de *Escherichia coli*.

| Prueba bioquímica | %positividad |
|------------------------|--------------|
| Oxidasa | 0 |
| Producción de indol | 98 |
| Rojo de metilo | 99 |
| Voges-Proskauer | 0 |
| Citrato de Simmons | 1 |
| H ₂ S (TSI) | 1 |

| | |
|-------------------------|-----|
| Hidrolisis de urea | 1 |
| Acido de Glucosa | 100 |
| Lisina descarboxilasa | 90 |
| Ornitina descarboxilasa | 65 |
| Movilidad a 36 °C | 95 |

Fuente: Agurto ⁽¹¹⁾

En la Tabla 6 se presenta un resumen de pruebas moleculares para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de *E. coli*.

Tabla 6: Pruebas moleculares para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli*.

| GRUPO | MECANISMO | PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN |
|-------------|---------------------------|---|
| ETEC | Enterotoxinas LT y ST | PCR (ST y LT) Elisa (ST y LT) Hibridación en fase sólida con sondas específicas (ST y LT). Efecto citopático en células CHO, VERO y Y1 (LT). RIA para ST. |
| EHEC | Citotoxinas STX 1 y STX 2 | Serotipificación. ELISA. Aglutinación en látex. Inmunofluorescencia. Extracción de plásmido (PCR) |
| EIEC | Invasividad | ELISA para el gen ipaC. PCR para genes ial, ipaH. Extracción de plásmido de 140MDa. Invasividad de células HeLa. |
| EPEC | Adherencia localizada | Adherencia localizada en células Hep-2 y HeLa. PCR. Plásmido EAF. Hibridación. |
| EAEC | Adherencia agregativa | Adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa. Plásmido de 65MDa. PCR. |

Fuente: Rodriguez ⁽²¹⁾

3.5.3. Extracción de ADN bacteriano

Para realizar la identificación de *Escherichia coli* patógeno mediante el método molecular, es necesario realizar primero la extracción de su ADN, para ello se han desarrollado diversas técnicas, pero que han seguido el mismo principio.

El procedimiento de desnaturalización alcalina, descrito por Birnboim & Doly constituye la base de varios protocolos de extracción de ADN. La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR ^(39, 40).

De los tres pasos críticos que componen el análisis de patógenos por PCR, la extracción de ADN es quizás el más conocido y sobre el que más control podemos ejercer.

La extracción del ADN de las células donde se halla confinado es un paso previo en muchos procedimientos analíticos y diagnósticos.

3.5.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Fue desarrollada por Kary B. Mullis en la década de los 80 y se basa en la complementación de bases que componen las cadenas de ADN y en la actividad de la enzima antes mencionada, amplificando millones de veces la secuencia, lo cual permite la fabricación de una cadena de ADN complementaria a otra ya existente ^(40, 41).

Es una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, donde se produce una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos en los que la secuencia blanco es amplificada tal cual. Por ello, es importante la actividad que realiza la enzima ADN polimerasa, la cual posee la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR ^(40, 41).

Este proceso está dividido en 3 fases térmicas, de manera gráfica podemos observarlo en la figura 5.

- Desnaturalización: Al ser el ADN una molécula compleja de doble cadena, es necesario que se encuentra como simple cadena para poder empezar la reacción, por ello el material genético se lleva a calor controlado unos minutos para poder romper los enlaces que mantienen unidos estas cadenas. Se realiza a aproximadamente 95°C.
- Hibridación: Una vez que el material genético ha sido desnaturalizado se mantiene la temperatura a un rango determinado (entre 40 – 60°C) para que cada "primer" se una a la región específica dentro de la cadena de ADN. Mantener la temperatura adecuada va a depender del tipo de "primer" con el que se trabaje ya que, si la temperatura no llega a ser la adecuada la unión del "primer" será inespecífica o incompleta.
- Extensión: Es la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la enzima, tomando como molde la cadena de ADN previamente

desnaturalizada. La temperatura a la que la polimerasa alcanza su máxima actividad suele ser de 72°C.

Los productos obtenidos mediante PCR se detectan generalmente mediante electroforesis ^(40, 41).

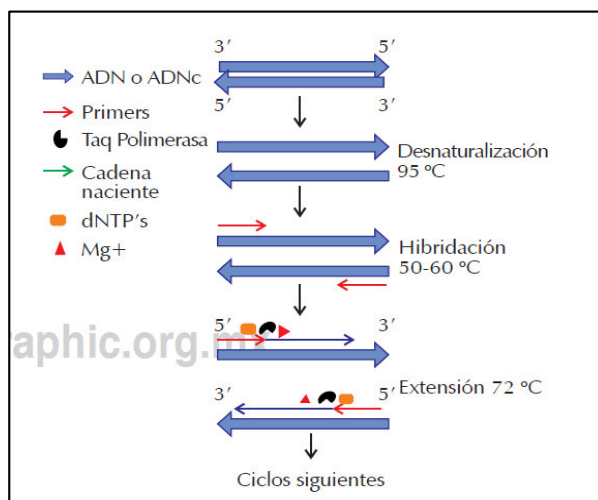


Figura 5. Etapas de la Reacción en cadena de la Polimerasa ⁽³⁹⁾.

3.5.4.1. PCR Multiplex:

Es una variante de una PCR convencional, descrita en 1988 por Chamberlain y colaboradores con el fin de amplificar secuencias múltiples para el gen de la distrofia muscular en humanos, desde entonces la PCR Multiplex ha sido empleada en muchas áreas para el análisis de marcadores múltiples ⁽⁴²⁾. Esta técnica consiste en amplificar simultáneamente varias secuencias a la vez, lo cual va a implicar que los reactivos empleados y el método empleado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibirla de las demás ^(42, 43).

Este método reduce el gasto tanto en empleo de reactivos como en tiempo del desarrollo de la técnica, pero también puede generar algunos inconvenientes como la formación de dímeros o fragmentos inespecíficos, por ello resulta esencial una óptima combinación entre temperatura de alineamiento y componentes de reacción con el fin de obtener una alta especificidad. Principalmente se optimiza la enzima polimerasa mediante la concentración de magnesio y de primers, el tipo y la concentración de la enzima a emplear; así como es necesario considerar emplear oligonucleótidos que no interaccionen entre sí y por ende no formen dímeros, que posean amplicones de tamaño suficientemente diferentes para separarlos y diferenciarlos tras la amplificación, entre otros ^(42, 43).

3.5.5. Electroforesis:

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) ^(39, 40, 44, 45).

3.5.5.1. Fundamentos de la electroforesis

Es un método analítico que permite separar biomoléculas mediante la migración de estas bajo la influencia de un campo eléctrico ^(39, 45).

La electroforesis se emplea para la separación de mezclas complejas de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, etc; ya que estas moléculas poseen grupos ionizables y en una solución se pueden presentar como aniones o cationes dependiendo la carga que posean, positiva (se dirigen al cátodo) o negativa (se dirigen al ánodo) y se van a separar siempre y cuando se aplique un voltaje mediante los electrodos ⁽³⁹⁾.

La velocidad con la cual se logre la migración va a depender de diversos factores: la carga neta, tamaño y forma de la molécula; la fuerza del campo eléctrico, así como su fuerza iónica y la porosidad del medio que se emplee para la electroforesis ⁽³⁹⁾.

En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo ^(39; 40; 41; 42).

Para analizar y caracterizar ácidos nucleicos se emplea con mayor frecuencia la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, estos geles permiten separar fragmentos de ADN y ARN dependiendo de su tamaño y forma, lo cual se logra visualizar mediante una tinción, además la distribución de la separación se verá

afectada por la concentración del gel de resolución con el cual se esté trabajando (41).

Esta metodología fue empleada por Vin Thorne a mediados de los años 60 para caracterizar distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polymavirus, donde se logró separar y visualizar 3 formas topológicas diferentes del ADN del virus (41).

Para la separación y purificación de fragmentos de ADN se emplea generalmente la electroforesis en geles de agarosa siempre y cuando no se requiera un alto poder de resolución, además el rango de tamaños que pueden separarse es alto y va a depender de la concentración del gel. Mientras que la electroforesis en geles de poliacrilamida se emplea cuando se requiere una mayor resolución ya que permite separar inclusive moléculas que difieren en un par de bases, aunque su elaboración y manipulación suele ser de mayor complejidad (43, 44).

3.6. Flujograma

En la figura 6 se detalla el flujograma de trabajo empleado en la investigación.

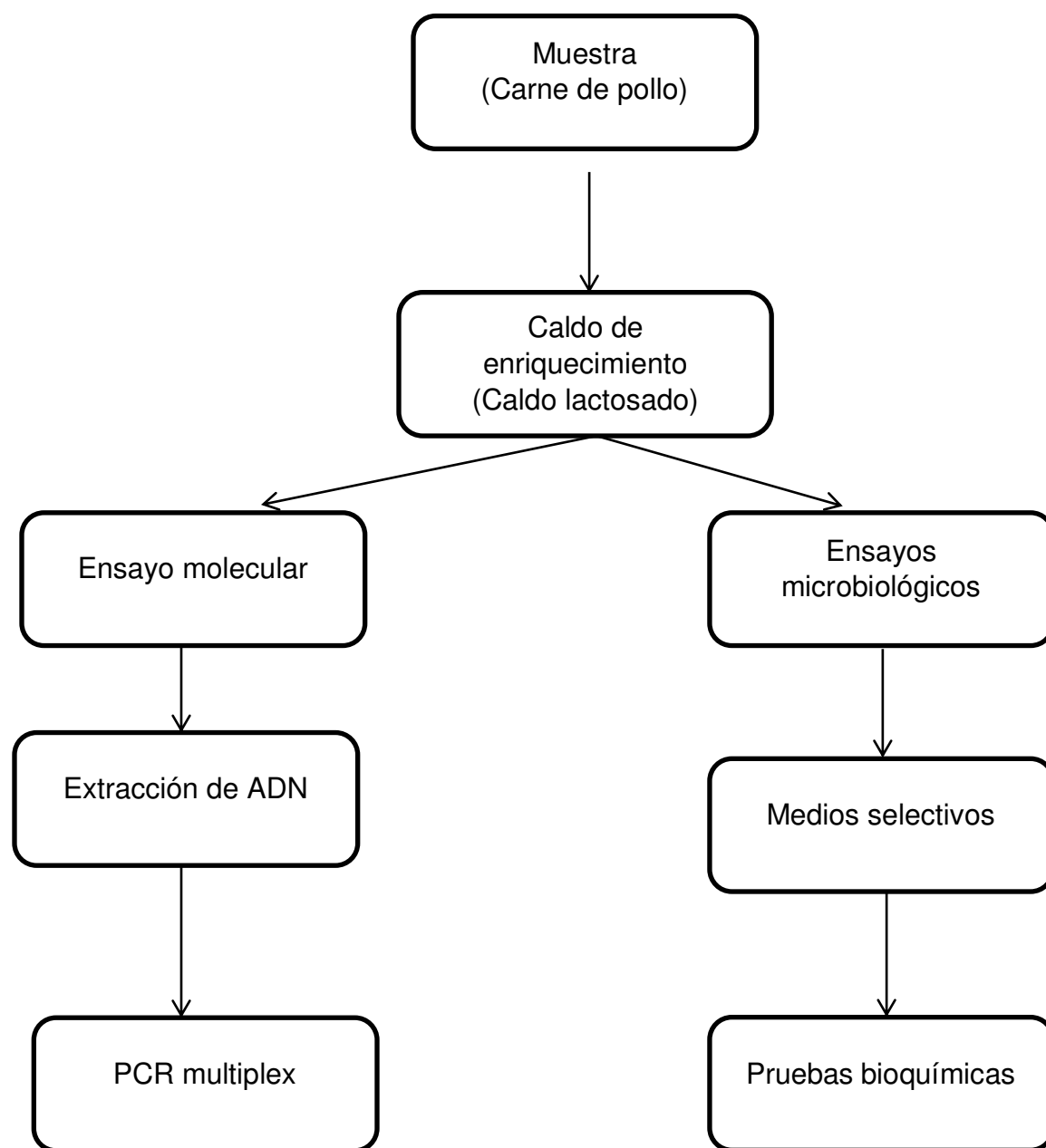


Figura 6. Flujograma del trabajo

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Tipo de Estudio

Descriptivo, prospectivo, transversal.

4.2 Tamaño de la muestra y plan de muestreo

Se recolectaron un total de 50 muestras de carne de pollo, las cuales corresponden a los mercados A, B, C, D, E, Supermercado X y Supermercado Y, tomándose 2 muestras de cinco puestos de los mercados iniciales, cuatro puestos del mercado central y de ambos supermercados, como se observa en la tabla 7; siendo la hora de muestreo de 7:00-8:00 horas. La recolección se llevó a cabo en las mismas condiciones en que es distribuido en el punto de venta ^(34, 35).

La metodología de muestreo se realizó utilizando un muestreo aleatorio (tipo de muestreo probabilístico) ⁽⁴⁶⁾. Este se llevó a cabo en los meses enero y febrero del 2016.

4.3 Transporte de muestras

Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno de primer uso y transportadas en un cooler expandido con hielo hacia el laboratorio para mantener la refrigeración (0-4°C) ^(34, 36) y luego fueron procesadas inmediatamente dentro de las 2 horas posteriores al muestreo.

4.4 Lugar de ejecución

En el Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Tabla 7. Origen de las muestras de carne de pollo.

| Mercados | Cantidad |
|-----------------|-----------------|
| A | 10 |
| B | 10 |
| C | 10 |
| D | 10 |
| E | 8 |
| X | 1 |
| Y | 1 |
| Total | 50 |

4.5 Materiales, Equipos y Reactivos

4.5.1 Materiales de laboratorio

- Asa de Kolle.
- Cooler BASA.
- Frasco de vidrio de boca ancha para reactivo de PCR: 1L Pyrex
- Frasco de vidrio de boca ancha para reactivo de PCR: 500 mL Pyrex.
- Frasco de vidrio de boca ancha para reactivo de PCR: 50 mL Pyrex.
- Frasco de vidrio de boca ancha para microbiológico: 500 mL Pyrex.
- Frasco de vidrio de boca ancha para microbiológico: 250 mL Pyrex.
- Frasco de vidrio de boca ancha para microbiológico: 100 mL Pyrex.
- Microtubos de 1,5 mL.
- Microtubos de 1 mL.
- Micropipetas de rango 0,5-50 µl Eppendorf.
- Micropipetas de rango 10-100 µl Eppendorf.
- Micropipetas de rango 100-1000 µl Eppendorf.

- Pinza estéril.
- Placas Petri estériles y descartables.
- Probeta de 100 mL Pyrex.
- Propipeta.
- Tijera estéril.
- Tubo de ensayo de 5 cm x 0,5cm Pyrex.
- Tips de 10, 100 y 200 μ l

4.5.2 Equipos

- Autoclave BIO-MEDICAL ELECTRONICS.
- Balanza electrónica SARTORIUS AG GERMANY CPA22AS con una capacidad de 220 g y sensibilidad 0,1 mg.
- Refrigeradora BOSCH.
- Congeladora BOSCH (-20 °C).
- Incubadora LABOR MÜSZERIPARI MÜVEK
- Microondas SAMSUNG.
- Microcentrifuga PLC-012E, GEMMY INDUSTRIAL CORP.
- Baño Maria con sistema de circulación J.P SELECTA S.A.
- Cocinilla OSTER.
- Termociclador EPPENDORF®.
- Cámara de electroforesis COMPACT XS/S, BIOMETRA®.
- Fuente de poder BIOMETRA®.
- Transiluminador ultravioleta UVstar312nm.Biometra

4.5.3 Medios cultivos

- Caldo Lactosado MERCK.
- Agar MacConkey MERCK.
- Agar Tergitol MERCK.
- Agar Triptosa de Soja (TSA) MERCK.
- Agar Citrato de Simmons MERCK.
- Agar Hierro Lisina (LIA) MERCK.
- Medio MIO MERCK.

4.5.4 Reactivos

- Reactivo de Kovacs
- Reactivo Tris EDTA, pH: 8 ± 1 .
- Proteinasa FERMENTAS
- Buffer KCl 10X.
- $MgCl_2$ 25mM.
- dNTPs FERMENTAS 0.2Mm.
- Mix primers 0.21 μ M: BfpA, eae, Stx 1 y Stx 2
- Taq Polimerasa 2.5 u FERMENTAS
- Agua Bidestilada.
- Gel Agarosa 1.2%.
- Buffer TBE 5X.
- 6X DNA Loading Buffer (Buffer de carga).
- Fluorescent DNA Loading dye (Buffer de revelado).

4.6 Metodología

4.6.1. Análisis microbiológico

La dilución de muestra fue de acuerdo a lo indicado en la normativa ISO 7218 ⁽⁴⁷⁾, y la metodología de aislamiento fue según la metodología empleada en Análisis Microbiológica de los Alimentos ⁽³⁵⁾.

4.6.2 Preenrequecimiento:

Se empleó el caldo lactosado, el cual es un medio rico en nutrientes, que no contiene inhibidores, lo que facilita el crecimiento de las bacterias orientando la presencia de coliformes, como *E. coli*, por el mecanismo degradativo (CO₂) con formación de burbujas debido a la fermentación de lactosa ya que produce gas y ácido. El extracto de carne y peptona, son la fuente de carbono y nitrógeno, mientras que la lactosa es el hidrato de carbono ⁽⁴⁸⁾.

Para la prueba se pesó aproximadamente 5g de la muestra de carne de pollo y se adicionó 45 mL caldo nutritivo de lactosa estéril sin antibióticos, se procedió a un homogenizado manual suave de 5 min lavando el material cárnico. Los caldos fueron incubados por 10 horas a 37°C, posterior a este periodo de tiempo se extrajeron alícuotas de 1.5 mL para las pruebas moleculares y microbiológicas.

4.6.2. Medios selectivos y pruebas bioquímicas

En el Agar McConkey, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva, por ello es usado para el

aislamiento selectivo de bacilos gram-negativos. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro) indicando la presencia *E. coli*, la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. El otro medio selectivo empleado fue el agar Tergitol, en este medio los microorganismos, como *E. coli*, son capaces de fermentar la lactosa produciendo colonias amarillas debido a la reacción con el indicador azul de bromotimol y las bacterias que no son capaces de fermentar este azúcar producen colonias azules ^(11, 48).

Se sembró alícuotas 50 µL extraídas de los caldos lactosados e incubadas en las placas a 37°C por 24 ± 2 horas.

Para las pruebas bioquímicas se utilizaron los siguientes medios:

- **Agar Citrato**, el cual se emplea para la diferenciación de Enterobacteriaceae en base a la utilización de fosfato monoamónico como la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio que es la única fuente de carbono, ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Mientras las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. Además, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. *Escherichia coli* no crecen en este medio debido a que utiliza lactosa como fuente de carbono en lugar de citrato, por lo tanto, no hay variación en el medio y el color verde se mantiene ^(11, 48).
- **Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)**, el extracto de carne y la pluriptona que presenta, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables,

que al ocurrir la degradación de cualquiera de los 3 se forman ácidos que hacen virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo; la degradación de lactosa ocurre en la parte superior, la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa en la parte profunda en condiciones anaeróbicas. En caso de no ocurrir la degradación de los azúcares, se producirá una alcalinización virando el indicador hacia un rojo acentuado. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, que son la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. *Escherichia coli* presenta un pico amarillo y base amarilla (A/A), produciendo gas en el tubo de prueba ^(11, 48).

- **Agar Lisina Hierro (LIA)**, la peptona y el extracto de levadura que contiene aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y deaminasa. Mientras que el citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. Por lo tanto, este medio permite evidenciar la descarboxilación del aminoácido lisina, la deaminación del mismo y la producción de ácido sulfhídrico. Se identifica *Escherichia coli* cuando el tubo de prueba presenta un pico y un fondo color lila (K/K) sin producción de ácido sulfhídrico ^(11, 48).
- **Medio MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)**, es altamente nutritivo debido a la presencia de extracto de levadura, peptona y triptéina. Además, la triptéina aporta grandes cantidades de triptófano, sustrato de la enzima triptofanasa,

para la realización de la prueba del indol. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo. En el caso de *Escherichia coli* el tubo de prueba presenta un color purpúrea, crecimiento bacteriano alrededor de la línea de siembra y se produce un color rojo en la parte superior del medio al adicionar un revelador ^(11, 48).

4.6.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se realizó mediante la metodología utilizada por Chuco E ⁽²⁶⁾, se partió del caldo de enriquecimiento lactosa del cual se extrajo una alícuota de 1.5 mL, posteriormente fue centrifugado por 10 min a 10 000 RPM, haciendo uso del equipo Microcentrifuga PLC-012E GEMMY INDUSTRIAL CORP. Los precipitados obtenidos se suspendieron en 100 µL de 0.5 M Tris-EDTA a pH 8 y posteriormente fueron centrifugados bajo las mismas condiciones de tiempo y velocidad; este proceso se repitió por 2 veces. El precipitado final se resuspendió en 100 µL de Tris-EDTA y se adicionó 10 µL de proteinasa K®, se llevó a baño María a una temperatura de 56 ± 2 °C por 30 min y luego a una temperatura de 100 °C por 10 min, empleando el equipo Baño María con Sistema de Circulación J.P SELECTA S.A. Finalmente las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez culminada la extracción se procede a determinar la calidad del ADN obtenido mediante electroforesis, 2 µL de ADN fueron cargados en un gel de agarosa al 1.2% de Agarosa preparado en el tampón TBE 1X, la corrida se

realizó en una cámara de electroforesis COMPACT XS/S, BIOMETRA ® durante 45min a un voltaje constante de 80V. Tras la corrida el gel fue coloreado con 2 µL de Fluorescent DNA Loading dye y visualizado en un Transiluminador ultravioleta UVSTAR 312nm, BIOMETRA ® (26, 49).

4.6.4 PCR Multiplex.

La PCR Multiplex para identificar *Escherichia coli* patógeno se realizó mediante la metodología propuesta por Morí L (28). Los primers empleados para el presente estudio se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Primers usados en el estudio

| Primers | Primera secuencia (5'→3') | Tamaño del Gen | Referencia |
|---------|--------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Eae -F | CATTATGGAACGGCAGAGGT | 384bp | Hossein ⁵⁰ (2015) |
| Eae -R | ACGGATATCGAAGCCATTTG | | |
| Stx2-F | CCATGACAACGGACAGCAGTT | 255bp | Hossein ⁵⁰ (2015) |
| Stx2-R | TGTCGCCAGTTATCTGACATTC | | |
| Bfp-F | GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT | 254bp | Mori ²⁸ (2013) |
| Bfp-R | GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT | | |
| Stx1-F | TGTCGCATAGTGGAACCTCA | 180bp | Hossein ⁵⁰ (2015) |
| Stx1-R | TGCGCACTGAGAAGAAGAGA | | |

Se utilizó el equipo Termociclador EPPENDORF ® para la amplificación del ADN, para ello se emplea el sobrenadante obtenido en el proceso de extracción de ADN previamente realizado.

Se preparó la mezcla de reacción conteniendo 5µL de buffer KCl 10X, 3 µL de MgCl₂ 25mM, 5 µL dNTPs de concentración 0.2 Mm, 1.05 µL de Mix primers 0.21µM, 0.5 µL de Taq Polimerasa 2.5 u y 33.45 µL de agua bidestilada, hasta hacer un volumen final de 48 µL finalmente se adicionó 2 µL del ADN previamente extraído.

Las condiciones de amplificación para la PCR Multiplex comprendieron 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg; hibridación a 53°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, según Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de amplificación

| <u>PASOS</u> | <u>TEMPERATURA</u> | <u>TIEMPO</u> | <u>N° DE CICLO</u> |
|---------------------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Desnaturalización Inicial | 95°C | 3 min | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 30 seg | 30 |
| Hibridación | 53°C | 1 min | 30 |
| Extensión inicial | 72°C | 1 min | 30 |
| Extensión final | 72°C | 5 min | 1 |
| Hold | 4°C | | 1 |

Electroforesis en Gel de Agarosa

5 µL de los productos de la amplificación de PCR Multiplex fueron separados en un gel de agarosa al 1.2% disuelto en el tampón TBE 1X, la corrida se realizó en una cámara de electroforesis COMPACT XS/S, BIOMETRA ® durante 45min a un voltaje constante de 80v. Como marcador de peso molecular se utilizó 1µL de 100 pb Ladder DNA marker. Tras la corrida el gel fue coloreado con 2 µL de Fluorescent DNA Loading dye y visualizado en un Transiluminador ultravioleta UVSTAR 312nm, BIOMETRA ®.

V. RESULTADO

4.1 Resultados microbiológicos

- **Medio selectivos**

Se determinó la presencia de *Escherichia coli* en los medios de cultivo selectivos, dando colonias de color rosado en el Agar McConkey y colonias de color amarillas en el Agar Tergitol, como se muestra en la figura 7 y 8 respectivamente.

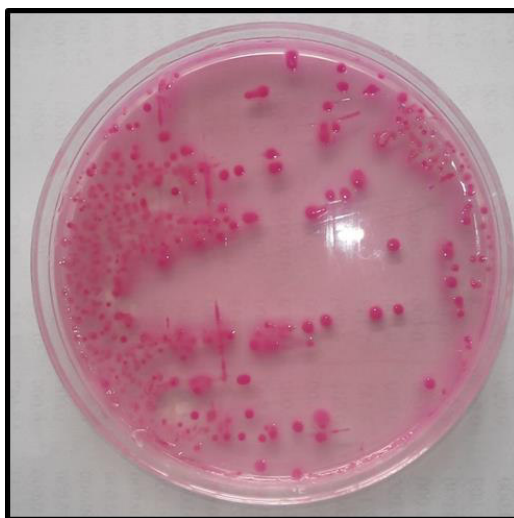


Figura 7. Crecimiento de colonias de color rosadas en agar MacConkey.

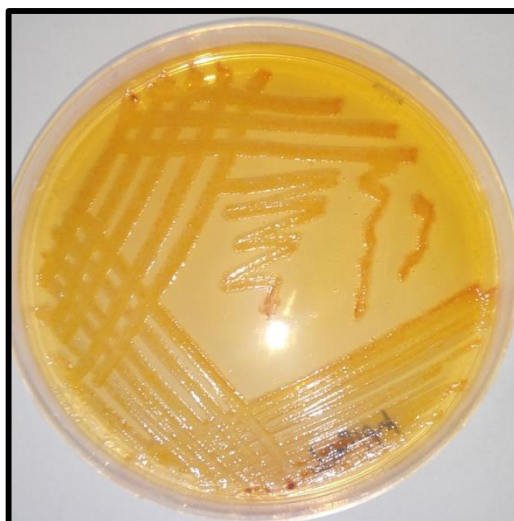


Figura 8. Crecimiento de colonias de color amarilla en agar Tergitol

- **Pruebas bioquímicas**

Una vez aisladas se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes a las 50 muestras trabajadas, de lo cual se obtuvo Citrato negativo (-), debido a que el medio permaneció de color verde y no hubo desarrollo de la bacteria en estudio; en el agar TSI se obtuvo un resultado positivo (+) lo cual presentó pico y fondo ácido (coloración amarilla), lo que indicó producción de gas, sin producción de ácido sulfhídrico. El agar LIA también presentó positividad ya que se observó pico y fondo púrpura sin ennegrecimiento del medio; el agar MIO nos mostró positividad para movilidad, indol y ornitina, según se observa en la tabla 10 y en la figura 9.

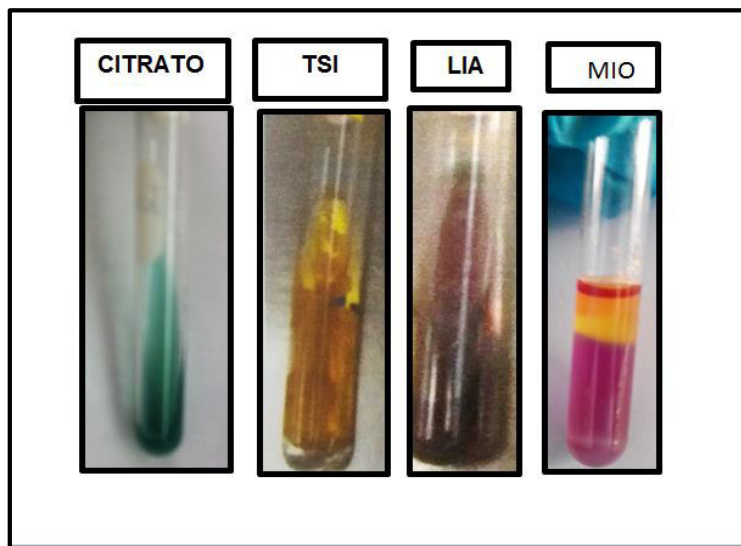


Figura 9. Pruebas bioquímica

Tabla 10. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* aislados de carne de pollo

| M | Mercado | PE | MC | T | Pruebas Bioquímicas | | | |
|----|---------|----|----|---|---------------------|---------|-----|-----|
| | | | | | MIO | Citrato | TSI | LIA |
| 1 | A | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 2 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 3 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 4 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 5 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 6 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 7 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 8 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 9 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 10 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 11 | B | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 12 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 13 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 14 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 15 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 16 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 17 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 18 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 19 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 20 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 21 | C | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 22 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 23 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 24 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 25 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 26 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 27 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 28 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 29 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 30 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |

| M | Mercado | PE | MC | T | Pruebas Bioquímicas | | | |
|----|---------|----|----|---|---------------------|---------|-----|-----|
| | | | | | MIO | Citrato | TSI | LIA |
| 31 | D | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 32 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 33 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 34 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 35 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 36 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 37 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 38 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 39 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 40 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 41 | E | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 42 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 43 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 44 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 45 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 46 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 47 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 48 | | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 49 | X | + | + | + | + | - | A/A | K/K |
| 50 | Y | + | + | + | + | - | A/A | K/K |

Leyenda de resultados

- Agar MacConkey (MC): Resultado positivo (+), colonias rosadas.
- Agar Tergitol (T): Resultado positivo (+), colonias amarillas.
- Medio MIO: Resultado positivo (+), presencia de movilidad, color púrpura e indol positivo.
- Agar citrato: Resultado negativo (-), el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.
- Agar TSI: Resultado positivo (A/A), se observó pico amarillo y fondo amarillo, producción de gas y sin producción de ácido sulfhídrico.
- Agar LIA: Resultado positivo (K/K), se observó pico púrpura y fondo púrpura, sin ennegrecimiento.

En la figura 10, representa un diagrama de barras simples de los resultados microbiológicos colocando en el eje X, el lugar de muestreo y el eje Y, la cantidad de muestra positivas que se encontraron.

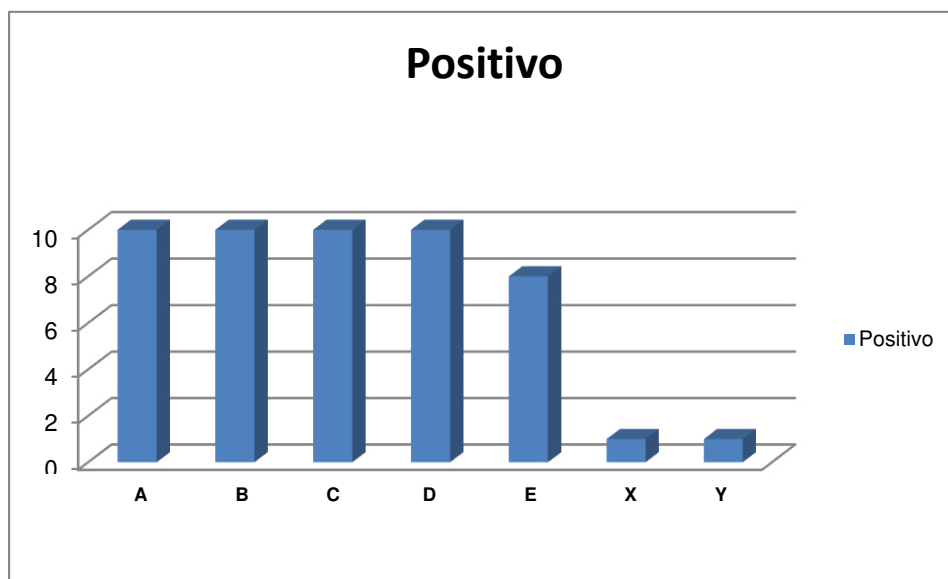


Figura 10. Resultado positivo, según el análisis microbiológico, de *Escherichia coli* en carne de pollo de los 5 mercados (A, B, C, D, E) y 2 supermercados (X, Y).

4.2. Resultados moleculares

- **PRC multiplex**

El ADN obtenido de la extracción fue sometido a una prueba de pureza mediante electroforesis, dando como resultado ADN puro y sin degradación.

Mediante el PCR Multiplex se amplificó en un único tubo secuencias específicas de la bacteria *Escherichia coli*, los cuales fueron analizados mediante electroforesis. Y se evidenció una banda de 180 pares de bases que se corresponde con el gen de la toxina shiga tipo 1 como vemos en la figura 11.

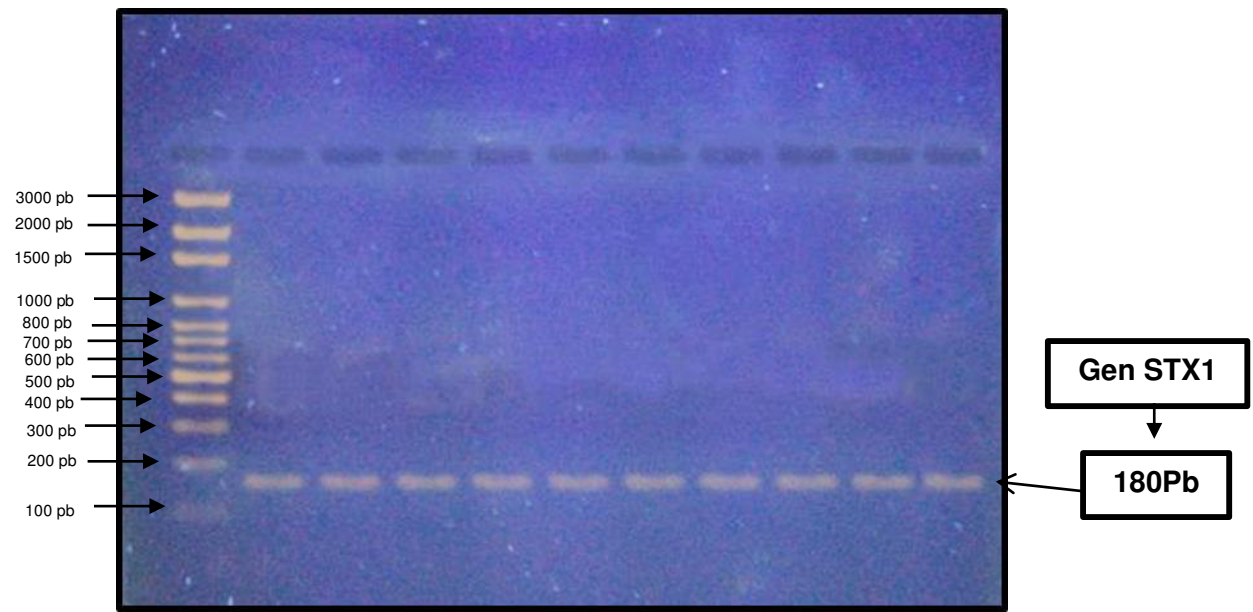


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa mostrando productos de amplificación por PCR con los primers stx1, stx2, eae y Bfp, para la detección *E. coli* patógeno en carne de pollo, en cada panel, carril M: marcador de tamaño molecular 100pb Ladder DNA marker AXYGEN , carril 1 y 2: mercado A, carril 3 y 4: mercado B, carril 5y 6: mercado C, carril 7: mercado D, carril 8: mercado E, carril 9 y 8: supermercados X y Y, corridos a un voltaje de 80v por 43min. Se observó la formación de una banda común de 180pb

VI. DISCUSIÓN

Escherichia coli representa uno de los principales patógenos en las enfermedades de transmisión alimentaria que afectan a la población infantil y a la población en general de los países en vías de desarrollo como el Perú. Es por ello que se requiere de métodos rápidos y confiables para la detección oportuna del microorganismo y de esta manera evitar consecuencias en la salud de la población.

La detección de *Escherichia coli* patógeno requiere su diferenciación de las especies no patogénicas de la microbiota intestinal; por ende, la detección y recuento de esta bacteria por el método convencional se dificulta por el hecho que no todas las cepas poseen las características típicas de *Escherichia coli* e inclusive es posible que algunas de estas bacterias pierdan los plásmidos responsables de la toxicidad durante los cultivos ⁽¹¹⁾.

Para la parte microbiológica se emplearon medios selectivos de cultivo como el agar Mc Conkey, el cual se emplea como medio selectivo para bacterias Gram negativas entéricas de fácil desarrollo, esto se da porque en su composición presenta sales biliares y cristal violeta que se encargan de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas. El otro medio selectivo empleado fue el agar Tergitol que actúa inhibiendo la flora secundaria indeseable, inhibe la difusión de “swarming” de *Proteus* y favorece una mayor recuperación de coliformes. Los microorganismos capaces de fermentar la lactosa en el medio producen colonias amarillas debido a la reacción con el indicador azul de bromotimol y los que no son capaces de fermentarla producen colonias azules ^(10, 11).

La metodología de extracción de ADN que se utilizó tuvo como referencia un estudio realizado en la caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* enterotoxigénica en alimentos frescos ⁽²⁶⁾. También, se consideró un estudio de Cardozo L (2012), el cual emplea dicha técnica de extracción para aislamiento de *Escherichia coli* no O157⁽⁵¹⁾. Por tanto, en este estudio se obtuvo un ADN de buena calidad.

Escherichia coli patógeno se clasifica de acuerdo a factores de virulencia específicos que suministran a cada categoría la capacidad de causar síndrome clínico diferentes; es por ello que la PCR múltiplex se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil en un futuro inmediato ya que presenta alta simplicidad en su ejecución y alta sensibilidad; aunque sin dejar de lado los métodos clásicos, los cuales deben ir en paralelo para corroborar los resultados de las pruebas moleculares ^(52, 53).

El presente estudio utilizó PCR multiplex para la detección de factores de virulencia que se encuentran en *Escherichia coli* patógeno, para lo cual se realizó la extracción de ADN genómico a partir de caldo preenriquecido, en cultivo de 10 horas con la finalidad de detectar *Escherichia coli* patógeno y no *Escherichia coli* comensales, porque las patógenas se encuentra en concentraciones bajas, y un cultivo más prologando favorecería el crecimiento de las comensales, dando lugar a falsos negativos ^(10, 11, 54).

Se ha identificado que la bacteria *Escherichia coli* se puede localizar en el intestino del ser humano y de animales de sangre caliente, como es el caso del pollo ⁽²⁹⁾. El estudio evidenció la presencia de *Escherichia coli* patógeno en las 50 muestras de

pollo provenientes de los 5 mercados y 2 supermercados de Lima Metropolitana. Se han encontrado antecedentes sobre estudios realizados en Lima, como el de Lucas J (2016), el cual realiza la detección de *Escherichia coli* en el ambiente donde es manipulada la carne de pollo teniendo como resultado el 42% y 25.3% de muestras positivas para *E. coli* y STEC, respectivamente, por lo cual la presencia de esta bacteria se produce por una contaminación cruzada, ya que el pollo aparentemente no es reservorio importante de STEC ⁽⁵⁵⁾.

Se detectó *Escherichia coli* productora de la toxina shiga, por la presencia del gen stx1 utilizado en el PCR multiplex que incluyó factores de virulencia tales como los genes stx1, stx 2, eae, bfp; los cuales también fueron utilizados en un estudio realizado por Fusco A (2010), para la detección de *Escherichia coli* diarreogénicos reportando en un total de 720 muestras clínicas analizadas dos STEC siendo stx1 y eae positivas ⁽⁵³⁾.

El ensayo de PCR multiplex amplificó el ADN genómico aislada de las muestras de carne de pollo, considerando los primers usados para los genes de factores de virulencia, los parámetros de amplificación fueron similares a los reportados en los estudios de prevalencia de toxina shiga producida por *Escherichia coli* en animales domésticos y comida realizado por Cobeljic M (2005), el cual muestra que de un total de 3616 muestras analizadas se obtuvo 12.3% de prevalencia para STEC ⁽⁵⁶⁾.

Los amplicones del PCR Multiplex evidenciaron *Escherichia coli* patógeno, debido a que se observó bandas de un peso molecular de 180 pares de bases que corresponden al gen stx1 y ausencia de bandas para los genes stx2, eae y bfp esto se corresponde con lo reportados en un estudio realizado, por Hossein (2015)

donde se emplearon primers similares stx1 de 180pb, stx2 de 255pb, eae 384pb en la detección y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 en aves ⁽⁵⁰⁾. Sin embargo, Méndez C (2013) hace referencia que los genes que codifican los factores de virulencia provienen de fagos y plásmidos, pueden o no estar presentes, adquirirse o inclusive perderse, lo que explica la posibilidad de que se presenten cepas de *Escherichia coli* O157:H7 negativas a uno o más factores de virulencia ⁽⁵⁷⁾.

En este estudio no se logra determinar la presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica, ya que la definición de una ECEH típica presenta principalmente la toxina shiga, el gen eae y lleva un plásmido pO157 de 60Mda (el cual lleva el gen de la enterohemolisina), según indica el estudio desarrollado por Huguet J (2002) ⁽⁵⁸⁾.

La investigación toma relevancia debido a que *Escherichia coli* patógeno es considerada una bacteria emergente que puede causar enfermedades graves en el ser humano tales como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico los cuales pueden desencadenar en el deceso de las personas ^(21, 23).

La contaminación por *Escherichia coli* podría deberse a las deficientes condiciones a la que se encuentra expuesta la carne de pollo, en la cual muchas veces no se ha mantenido la cadena de frío durante la mayor parte del día, además de almacenarse en recipientes con agua sucia o que carecen de una sanitización. En los mercados vemos como los manipuladores de estos productos emplean utensilios sucios e inclusive con avanzado estado de oxidación.

Todas estas condiciones se muestran favorables para una posible contaminación bacteriana.

VII. CONCLUSIÓN

- Se determinó y caracterizó la presencia de *Escherichia coli* productora de toxina shiga 1 en las muestras mediante el método de PCR multiplex.
- Se logró la recuperación de *Escherichia coli* patógeno a partir de un caldo de enriquecimiento lactosa.
- Se logró aislar *Escherichia coli* en medios selectivo como agar Mc Conkey y agar Tergitol.
- Se identificó *Escherichia coli* mediante las pruebas bioquímicas de Citrato, TSI, LIA y MIO.
- El PCR multiplex detectó, la presencia del gen Stx1, lo que indica la presencia de *Escherichia coli* productora de toxina shiga tipo 1.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. MINAG. Boletín Estadístico mensual del sector avícola. DGESEP. Febrero de 2015.
2. OMS. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. OMS: Centro de prensa. 03 de diciembre del 2015. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/> (Último acceso 17 de junio del 2016).
3. El Comercio. Muertos por la bacteria E. coli en Europa aumentaron a 40. El Comercio. Junio 2011. <http://elcomercio.pe/mundo/actualidad/muertos-bacteria-coli-europa-aumentaron-40-noticia-789131> (Último acceso 2 noviembre del 2016).
4. Expansión. Perú declara una alerta epidemiológica por brote de *Escherichia coli* en Europa. Expansión con CNN. Junio 2011. <http://expansion.mx/mundo/2011/06/14/peru-declara-una-alerta-epidemiologica-por-brote-de-e-coli-en-europa> (Último acceso 25 de Setiembre del 2016).
5. La República. Perú en alerta por bacteria *Escherichia coli*. La República. Junio 2011. <http://larepublica.pe/10-06-2011/peru-en-alerta-por-bacteria-e-coli> (Último acceso 12 de octubre de 2016).
6. FAO. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales: *Escherichia coli*. FAO: División de Producción y Sanidad Animal. Junio 2008. <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf> (Último acceso 17 de mayo del 2016).

7. FAO. Perspectivas alimentarias: resúmenes de mercado. ONU. Octubre 2014.
8. WHO. Día Mundial de la Salud 2015: Inocuidad de los alimentos. <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/es/> (Último acceso 12 de junio del 2016).
9. WHO. Foodborne Disease Burden Epidemiology reference Group 2007 – 2015. World Health Organization. Switzerland; 2015.
10. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 6a ed. Buenos Aires: Ed Médica Panamericana SA; 2008.
11. Agurto, Tomás. Microbiología: Bioquímica Bacteriana. Lima: Ed Imprenta Unión; 2009.
12. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 6ª ed. Barcelona: Ed Mosby; 2009.
13. Chavez E, Martinez L, Cedillo M, Juárez C, Flores F, Castañeda E. Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enf Inf Microbiol*. 2007; 27 (3): 70-4.
14. Vidal J, Canizales A, Gutiérrez J, Navarro F. Patogénesis Molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública*. 2007;49:376-86.
15. Diarrea causada por cepas enteroinvasoras (EIEH). En El control de las enfermedades transmisibles J Chin, OPS / OMS, 17 edición, Washington DC, 2001:123-24.

16. WHO. *E. coli* enterohemorrágica. WHO. 03 de diciembre del 2011.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> (Último acceso 28 de mayo de 2016).
17. Jure M, Condori M, Pérez G, Catalán M, López A, Zolezzi G, et al.
Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos
cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Rev Argent
Microbiol.* 2015; 47(2): 125-31.
18. James N, James K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*
1998; 11: 142-01.
19. Pistone V, Nuñez P, Boccoli J, Silberstein C, Zotta E, Golstein J y col. Papel
de la toxina shiga en el Síndrome Urémico Hemolítico. *Rev Argent
Microbiol*, 2006; 66 (3): 11-5.
20. Pistone V, Nuñez P, Zotta E, Ibarra C. Efecto citotóxico de la toxina shiga
tipo 2 y su subunidad b en células epiteliales tubulares renales humanas en
cultivo. *Rev Argent Microbiol*, 2005; 65: 147-50.
21. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos
patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública.* 2002; 44: 464-75.
22. Blanco M, Schumacher S, Tasara T, Zweifel C, Blanco J, Dahbi G, y col.
Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive
Escherichia coli strains isolated from healthy cattle in Switzerland.
Identification of a new intimin variant gene (*eae-n2*). *BMC Microbiology.*
2005; 5: 23-4.
23. Bretscheider G, Pérez S. Enterohemorrhagic *E. coli*: Virulence factors and
infection in Cattle. *Analecta Vet.* 2010; 30 (2): 45-6.

24. Diarrea causada por *E. coli* enteroagregativa (EAEH). En El control de las enfermedades transmisibles J Chin, OPS / OMS, 17 edición, WashingtonDC,2001:127-28.
25. Diarrea causada por *E. coli* de adherencia difusa (ADEH). En El control de las enfermedades transmisibles J Chin, OPS / OMS, 17 edición, Washington DC, 2001:128-29.
26. Chuco E. Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Escherichia coli* enterotoxigénica en alimentos frescos. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2014.
27. Farfán A, Ariza S, Vargas F, Vargas L. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Rev chilena Infectol. 2016; 33 (4): 438-50.
28. Mori L. Genotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de crias de alpacas procedentes del departamento de Puno mediante PCR Multiplex. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2013.
29. OMS. Enfermedades diarreicas. OMS: Centro de prensa. Abril del 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/> (Último acceso 04 de mayo del 2016).
30. Rivas M., Leotta G., Chinen I., Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Buenos Aires. Who Global Salm Surv. 2008.
31. OMS. Enfermedades transmitidas por alimentos. PAHO. Agosto del 2016. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836%3A2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-

eta&catid=7678%3Ahaccp&Itemid=41432&lang=en (Último acceso 04 de setiembre del 2016).

32. OMS. *Escherichia coli*. OMS. Diciembre del 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> (Último acceso 25 de febrero del 2016).

33. Ministerio de Salud. Retiro De Productos Por Posible Contaminación De *E. coli*. 2013.

34. Ministerio de Salud. Procedimiento para la Recepción de Muestras de Alimentos y Bebidas de Consumo Humano en el Laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud. DIGESA. Directiva Sanitaria N° 032 – MINSA/DIGESA – V. 01. Perú 2011: 10-7.

35. Ministerio de Salud. ANMAT. Análisis Microbiológico de los Alimentos. 2011: 55 – 100.

36. Ministerio de Salud. DIGESA. Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos. 2001: 12-05.

37. MINSA. Norma sanitaria que estable los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Resolución ministerial N°591.Lima .2008.

38. Castañeda Serrano MP, Braña Varela D, Rosario Cortés C, Martínez Valdés W. Calidad microbiológica de carne de pollo. Libro técnico No.9.Ajuchitlán, Colón Querétaro.2013

39. Garcia H, Electroforesis en gel de Poliacrilamida: Fundamentos, actualización e importancia. UNIV DIAG 2000;1(2):31-1.

40. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción que cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Mediagraphic. 2013; 2 (2): 70-8.
41. Valcárcel Hervás L. Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. 2014.
42. Zambrano A. Implementación de un ensayo PCR Multiplex para la Identificación de las enterovariedades de *Escherichia coli* patógenas [Tesis]. Sangolqui; Escuela Politécnica del Ejército. Facultad de Biotecnología. 2012.
43. Bolívar A, Rojas A, García-Lugo P. PCR y PCR Múltiple: Parámetros críticos y protocolo de estandarización. Inst de Inmunología Clínica. 2014; 3 (1): 25 – 3.
44. R. Poutou, M. Burbano, S. Sierra, K. Torres, A. K. Carrascal, M. Mercado. estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. Rev de la Facultad de Ciencias. 2005; 10 (2) :61-8.
45. INS. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Inst. Nac. De Salud. 2003.
46. Mateu E, Casal J. Tipos de muestreo. Rev Epidem Med Prev. 2003; 1: 3-7.
47. International Standard. ISO 7218: Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. Ginebra: International Standard; 2007.

48. Crispín V, Salcedo D. Medio de Cultivo: Interpretación Bioquímica. UNMSM. Lima, 1987.
49. Fonseca Mendoza D, Mateus Arbeláez H, Contreras Bravo N. Prácticas de laboratorio de Biología Molecular: Bogotá: Universidad del Rosario: 2010.
50. Hossein E, Ali K, Fatermeh G. Detection and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from feral pigeon in Qom province, Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(2): 116-18.
51. Cardozo L, Martínez R, Feng P, Villalobos L. Primer aislamiento de *Escherichia coli* no O157 productor de toxina Shiga en carnes bovina y porcina en Venezuela. Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología. 2012; 32:107-11.
52. Bai J, Shi X, Nagaraja T. A Multiplex PCR procedure for the Detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Microbiological Methods. 2010; 82: 85-9.
53. Fusco da Costa AR, Oliveira de Sousa C, Batista Lima KV, Brito Loureiro EC. Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. Rev Pan-Amaz Saude. 2010; 1(2):77-4.
54. Nari L, Kyung YK, Su KO, Hyun-Joo Ch. Hyang SCH, Sung WK. A multiplex PCR assay for simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food. Korea. Foodborne Pathogens and Disease. 2014; 11 (7):574-80.

55. Lucas J, Morales S, Salazar E, Eslava C, Alvarado D. Contaminación por *Escherichia coli* Shigatoxigénica en puestos de expendio de carne de pollo en un distrito de Lima. Rev Inv Vet Perú. 2016; 27(3): 618 – 25.
56. M. Cobeljic, B. Dimic, D. Opacic, Z. Lepsanovic, V. Stojanovic, S. Lazic. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. Epidemiol. Infect. 2005; 133:359–66.
57. Méndez C, Vergaray G, Morante H, Flores P, Gamboa R. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima – Perú. Rev Peru Biol. 2013; 20 (2): 159 – 64.
58. Huguet J, Huapaya B, Salazar E. Determinación de Factores de Virulencia asociados a *Escherichia coli* Enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. Rev Peru Med. 2002; 19 (2): 63 – 7.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Mercados y Supermercado

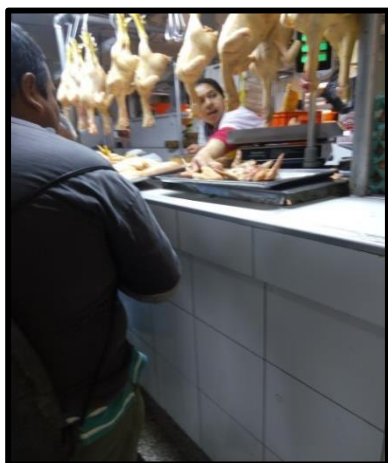


Figura 12. Puesto de venta en el Mercado de Central



Figura 13. Punto de venta ubicado en el Mercado Valle Sagrado Huáscar



Figura 14. Punto de venta en el Mercado Mujer Peruana



Figura 15. Supermercados Metro y Plaza Vea.

Anexo 2. Carne y cortes de pollo

Figura 16.



Figura 17.



Figura 18.



Figura 19.



Anexo 3: Equipos empleados



Figura 20. Equipo para la extracción de ADN

Figura 21. Equipo para la amplificación de ADN

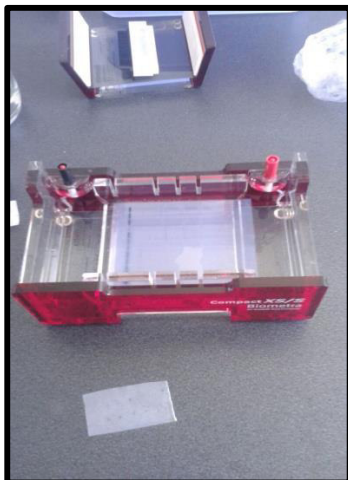


Figura 22. Equipo para la Electroforesis de ADN